

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005 年 7 月 7 日 (07.07.2005)

PCT

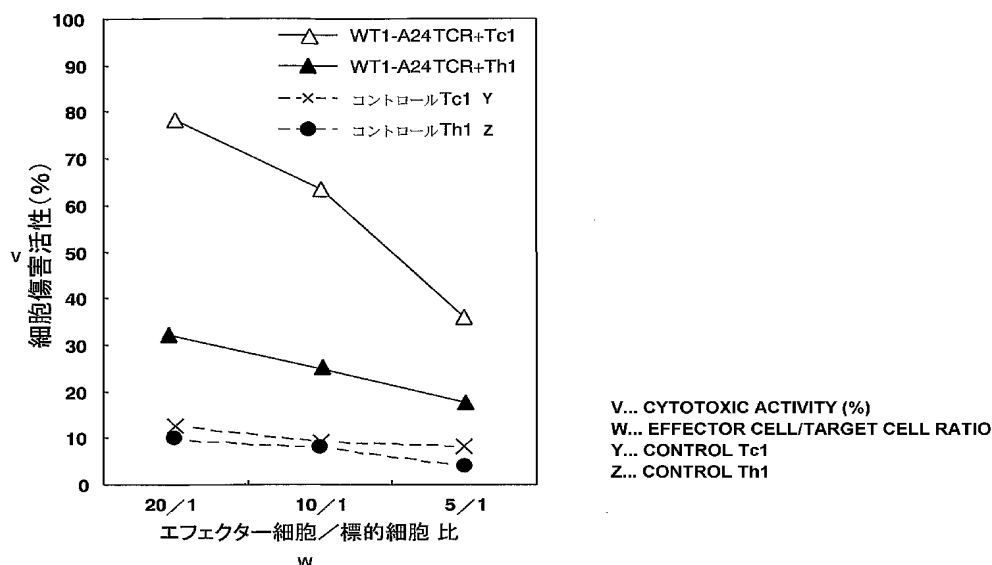
(10) 国際公開番号
WO 2005/061697 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 5/10, 15/12, A61K 35/26, A61P 35/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/019714
- (22) 国際出願日: 2004 年 12 月 22 日 (22.12.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2003-425009
2003 年 12 月 22 日 (22.12.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 北海道
ティー・エル・オー株式会社 (HOKKAIDO TECHNOLOGY LICENSING OFFICE CO., LTD.) [JP/JP];
〒0600807 北海道札幌市北区北 7 条西 2 丁目 8 番
地 1 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 西村 孝司
(NISHIMURA, Takashi) [JP/JP]; 〒0050005 北海道札幌市南区澄川 5 条 5 丁目 1 0 番 1 7 号 Hokkaido (JP).
安川 正貴 (YASUKAWA, Masaki) [JP/JP]; 〒7900852 愛媛県松山市石手 3 丁目 8 - 4 Ehime (JP).
- (74) 代理人: 大野 聖二, 外(OHNO, Seiji et al.); 〒1006036 東京都千代田区霞が関 3 丁目 2 番 5 号 霞が関ビル 3 6 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING ENGINEERED TARGETED T CELL AND MEDICINE

(54) 発明の名称: 改変標的化 T 細胞の製造方法及び医薬



(57) Abstract: Novel process for producing tumor-specific T cells. Tumor-specific T cells having antitumor activity are produced by introducing TCR gene of tumor-specific CTL in nonspecifically activated T cells having antitumor activity. This realizes a tumor-specific cell immunotherapy even from a small amount of blood. According to this process, there can be obtained MHC class I restricted tumor-specific Th cells, and can be produced cells exhibiting helper and antitumor activities through reaction with tumor cells that express MHC class I molecules.

[続葉有]

WO 2005/061697 A1



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約: 腫瘍特異的T細胞を製造するための新規な方法が開示される。非特異的に活性化した抗腫瘍活性をもつT細胞に、腫瘍特異的CTLのTCR遺伝子を導入することにより、抗腫瘍活性をもつ腫瘍特異的T細胞を製造し、少量の血液からでも腫瘍特異的な細胞免疫治療法を可能にする。この方法によりMHCクラスI拘束性の腫瘍特異的Th細胞が得られ、MHCクラスI分子を発現する腫瘍細胞に反応して抗腫瘍活性およびヘルパー活性を示す細胞を製造することができる。

明細書

改変標的化T細胞の製造方法及び医薬

技術分野

- 5 本発明は、非特異的に活性化した抗腫瘍活性を有するT_h細胞またはT_h1細胞およびT_c1細胞に、腫瘍抗原を特異的に認識するT細胞レセプターの遺伝子を導入することからなる、特異的に腫瘍細胞を傷害しうる活性化T細胞医薬の製造方法と応用に関する。

10 背景技術

本特許において癌とは悪性新生物をいい、また癌と腫瘍は、同義として扱うものとする。

- 末梢血より分離した単核球をインターロイキン-2（IL-2）存在下で培養することにより、ナチュラルキラー（NK）細胞抵抗性の腫瘍に対して幅広く抗
15 腫瘍活性をもつリンフォカイン活性化キラー（Lymphokine Activated Killer, LAK）細胞を誘導することができる（例えば、Grimm ら, 1982. J. Exp. Med., 155: 1823-1841 を参照）。その後、遺伝子組み換え技術により大量のIL-2が入手可能となり（例えば、Taniguchi ら, 1983. Nature, 302: 305-310 を参照）、腫瘍に対するLAK細胞を用いた養子免疫療法の臨床応用がなされ、その
20 有用性が示された（例えば、Rosenberg ら, 1985. New Engl. J. Med., 313: 1485-1492 を参照）。

- さらにIL-2に抗CD3モノクローナル抗体（MoAb）を加えて培養することにより、少量の末梢血から得られた単核球よりLAK活性をもつ細胞を大量に培養することが可能となった（例えば、Ochoa ら, 1987. J. Immunol., 138:
25 2728-2733 を参照）。

末梢のTリンパ球は細胞表面にT細胞レセプター（TCR）と共にCD3分子を発現しており、CD4またはCD8分子の発現の違いにより、ヘルパーT（T_h）細胞または細胞傷害性T細胞（CTL）に分類される。

細胞表面に発現した分子（たとえばCD4分子、CD8分子）に対するMoA

bと磁気ビーズを用いることにより、目的の細胞表面抗原を有する細胞を濃縮または除去することができる（例えば、日本特許第2530966号を参照）。

Th細胞はインターフェロン- γ （IFN- γ ）、IL-2などのサイトカインを産生するTh1細胞と、IL-4、IL-10などのサイトカインを産生するTh2細胞に分けられ（例えば、Mosmannら、1986. J. Immunol., 136: 2348-2357を参照）、Th1細胞は細胞性免疫のエフェクターとして働き、Th2細胞は体液性免疫の調節を担っている。またTh1細胞が産生するIFN- γ はTh2細胞を抑制し、Th2細胞が産生するIL-4はTh1細胞を抑制する（例えば、Maggiら、1992. J. Immunol., 148: 2142-2147を参照）。

- 10 初期のTh細胞活性化の際にIL-12の存在によりTh1細胞の分化が起こり（例えば、Sederら、1993. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 10188-10192を参照）、IL-4の存在によりTh2細胞の分化が起こる（例えば、Hsiehら、1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 6065-6069を参照）。

- 15 一方、CTLは、Th1細胞およびTh2細胞と同様のサイトカイン産生パターンにより、Tc1細胞とTc2細胞とに分類される。Tc1細胞は強力な細胞傷害性を示し、Tc2細胞は免疫抑制的作用を担っており、IL-12またはIL-4の存在によりTc1細胞またはTc2細胞へ分化する（例えば、Mosmannら、1996, Immunology Today, 17: 138-146を参照）。

- 20 T細胞はTCRによりMHC分子／抗原ペプチド複合体を認識して、抗原提示細胞（APC）などの標的細胞に結合するが、CTLはMHCクラスI分子／抗原ペプチドの複合体のみに結合し（MHCクラスI拘束性）、Th細胞はMHCクラスII分子／抗原ペプチドの複合体のみしか結合できない（MHCクラスII拘束性）とされている。

- 25 また、MHCクラスI分子はほとんどの有核細胞に発現しているが、MHCクラスII分子は限られた一部の細胞しか発現していない。このためTh細胞はMHCクラスII分子を発現した樹状細胞やB細胞、活性化T細胞などとは結合できるが、これら以外の腫瘍細胞や感染細胞などには直接結合することができない。

しかし遺伝子操作によってMHCクラスI拘束性とされるCTL由来のTCR遺伝子を導入したMHCクラスII拘束性とされるCD4陽性CD8陰性T細胞

が、対応抗原をパルスしたAPCとCD8非依存的に反応して活性化されることができ、対応抗原に結合できるTCRを発現していることが示された。また、非特異的な抗腫瘍活性をもつ末梢血リンパ球に腫瘍抗原特異的CTL由来のTCR遺伝子を導入することにより、特異的に腫瘍を傷害することができる（例えば、

5 Morgan ら, 2003. J. Immunol., 171: 3287-3295 を参照）。

生体外で腫瘍特異的T細胞を誘導するためには、手術によって患者本人の腫瘍組織を得る必要がある。また最近では腫瘍抗原ペプチドを用いた腫瘍特異的T細胞の誘導が可能となっているが、限られたタイプのMHCを有する患者しか適応できない。

10 さらに腫瘍特異的T細胞を誘導するためには、多くの手間と時間さらには誘導に使用するAPCを得るために大量の血液を必要とし、細胞治療に必要な量の腫瘍特異的T細胞を得るのは困難である。

したがって、本発明は、腫瘍特異的T細胞、特にTh細胞あるいはTh1細胞とTc1細胞を製造するための新規な方法を提供することを目的とする。

15 さらに、MHCクラスI分子はほとんどの有核細胞に発現するが、MHCクラスII分子は活性化した細胞を含む一部の細胞にしか発現していないため、ヘルパーT細胞は全ての細胞に直接結合できるわけではない。

したがって、本発明は、MHCクラスI分子に結合しうる腫瘍特異的ヘルパーT細胞、特にTh1細胞を製造するための新規な方法を提供することを目的とする。
20

発明の開示

本発明者らは、非特異的な抗腫瘍活性をもつTc1細胞に腫瘍特異的TCR遺伝子を導入することにより、腫瘍細胞を特異的に傷害しうる細胞に加工できることを見い出した。さらに非特異的に活性化したMHCクラスII拘束性のTh1細胞に、MHCクラスI拘束性の抗原特異的CTLより得られたTCR遺伝子を導入することにより、MHCクラスI分子／抗原ペプチド複合体と反応できるヘルパー活性さらには抗腫瘍活性を有する細胞に加工できることを見い出した。

本発明は、非特異的な抗腫瘍活性をもつTh細胞を誘導する工程と、そのTh

細胞に抗原特異性を付与するための工程とを含むことを特徴とする、細胞治療用の細胞の製造方法を提供する。好ましくは、T細胞に抗原特異性を付与するための工程は、癌関連抗原を認識するTCRの遺伝子を導入することにより行われる。また好ましくは、Th細胞に抗原特異性を付与するための工程は、癌関連抗原を認識するクラスI拘束性TCRの遺伝子を導入することにより行われる。また好ましくは、Th細胞に抗原特異性を付与するための工程は、癌関連抗原を認識するクラスII拘束性TCRの遺伝子を導入することにより行われる。

5 本発明はさらに、非特異的な抗腫瘍活性をもつTh細胞を誘導する工程と、そのTh細胞に抗原特異性を付与するための工程とを含む方法により製造される、細胞治療用の細胞を提供する。別の態様においては、本発明は、患者から白血球細胞を取り出す工程と、前記白血球細胞から非特異的な抗腫瘍活性をもつTh細胞を誘導する工程と、そのTh細胞に抗原特異性を付与するための工程と、抗原特異性を付与されたTh細胞を前記患者に投与する工程とを含むことを特徴とする、腫瘍の予防または治療方法を提供する。

15 別の態様においては、本発明は、非特異的な抗腫瘍活性をもつTh1細胞とTc1細胞を誘導する工程と、そのTh1細胞とTc1細胞に抗原特異性を付与するための工程とを含むことを特徴とする、細胞治療用の細胞の製造方法を提供する。好ましくは、T細胞に抗原特異性を付与するための工程は、癌関連抗原を認識するTCRの遺伝子を導入することにより行われる。また好ましくは、Th1細胞とTc1細胞に抗原特異性を付与するための工程は、癌関連抗原を認識するクラスI拘束性TCRの遺伝子を導入することにより行われる。また好ましくは、Th1細胞とTc1細胞に抗原特異性を付与するための工程は、癌関連抗原を認識するクラスII拘束性TCRの遺伝子を導入することにより行われる。

25 本発明はさらに、非特異的な抗腫瘍活性をもつTh1細胞とTc1細胞を誘導する工程と、そのTh1細胞とTc1細胞に抗原特異性を付与するための工程とを含む方法により製造される、細胞治療用の細胞を提供する。別の態様においては、本発明は、患者から白血球細胞を取り出す工程と、前記白血球細胞から非特異的な抗腫瘍活性をもつTh1細胞とTc1細胞を誘導する工程と、そのTh1細胞とTc1細胞に抗原特異性を付与するための工程と、抗原特異性を付与され

たTh1細胞とTc1細胞を前記患者に投与する工程とを含むことを特徴とする、腫瘍の予防または治療方法を提供する。

本発明の方法において、好ましくは、癌関連抗原は、WT1、CEA、AFP、CA19-9、CA125、PSA、CA72-4、SCC、MK-1、MUC-1、p53、HER2、G250、gp-100、MAGE、BAGE、SART、MART、MYCN、BCR-ABL、TRP、LAGE、GAGEおよびNY-ESO1からなる群より選択される。

別の態様においては、本発明の方法において、非特異的な抗腫瘍活性をもつTh細胞を誘導する工程は、患者の末梢血などから採取したT細胞を含む材料を、
10 抗CD3抗体、IL-2の存在下で培養することにより行われる。

別の態様においては、本発明の方法において、非特異的な抗腫瘍活性をもつTh1細胞とTc1細胞を誘導する工程は、患者の末梢血などから採取したT細胞を含む材料を、抗CD3抗体、IL-2、およびIL-12の存在下、好ましくは抗CD3抗体、IL-2、IL-12および抗IL-4抗体の存在下、さらに
15 好ましくは抗CD3抗体、IL-2、IL-12、抗IL-4抗体およびIFN- γ の存在下で培養することにより行われる。

別の態様においては、本発明の方法は、抗原特異性を付与されたTh1細胞とTc1細胞とを分離する工程をさらに含む。好ましくは、抗原特異性を付与されたTh1細胞とTc1細胞とを分離する工程は、抗体磁気ビーズを使用すること
20 により行われる。

別の態様においては、本発明の方法は、分離されたTh1細胞とTc1細胞を任意の割合で混合する工程をさらに含む。

図面の簡単な説明

25 図1は、WT1ペプチドをパルスしたLCL細胞またはペプチドをパルスしないLCL細胞との共培養によるWT1-A24TCR+Th1細胞とWT1-A24TCR+Tc1細胞のIFN- γ 産生能の比較を示す。

図2は、WT1ペプチドをパルスしたLCL細胞またはペプチドをパルスしないLCL細胞との共培養によるWT1-A24TCR+Th1細胞とWT1-A

24 TCR+Tc1細胞のIL-2産生能の比較を示す。

図3は、WT1-A24TCR+Th1細胞とWT1-A24TCR+Tc1細胞のペプチドをパルスしたLCL細胞に対する細胞傷害活性を示す。

5 発明の詳細な説明

本発明の細胞治療用の細胞の製造方法は、非特異的な抗腫瘍活性をもつTh細胞を誘導する工程と、そのTh細胞に抗原特異性を付与するための工程とを含む。

非特異的な抗腫瘍活性をもつTh細胞は、以下のようにして誘導することができる。ヒトの末梢血から比重遠心法等の方法により回収した単核球を、抗CD3
10 抗体、IL-2の存在下に、培地（AIM-V：インビトロジェン社、ヒトAB型血清、培養細胞と同一血液型、好ましくは自己血清を0.1～30%、好ましくは5～10%）で培養する。IL-2の終濃度は10～2000IU/ml、好ましくは50～500IU/mlである。このようにして、抗原非特異的に活性化したTh細胞を誘導することができる。

- 15 別の態様においては、本発明の細胞治療用の細胞の製造方法は、非特異的な抗腫瘍活性をもつTh1細胞とTc1細胞を誘導する工程と、そのTh1細胞とTc1細胞に抗原特異性を付与するための工程とを含む。

非特異的な抗腫瘍活性をもつTh1細胞とTc1細胞は、以下のようにして誘導することができる。ヒトの末梢血から比重遠心法等の方法により回収した単核
20 球を、抗CD3抗体、IL-2、およびIL-12の存在下、好ましくは抗CD3抗体、IL-2、IL-12および抗IL-4抗体の存在下、さらに好ましくは抗CD3抗体、IL-2、IL-12、抗IL-4抗体およびIFN- γ の存在下で培養するの存在下に、培地（AIM-V：インビトロジェン社、ヒト血清添加：AB型血清、培養細胞と同一血液型、好ましくは自己血清を0.1～3

- 25 0%、好ましくは5～10%）で培養する。各サイトカインの好ましい濃度は、終濃度で、IL-2については、10～2000IU/ml、好ましくは50～500IU/mlであり、IL-12については、1～1000IU/ml、好ましくは10～200IU/mlであり、IFN- γ については、1～500ng/ml、好ましくは5～100ng/mlであり、抗IL-4抗体については、

0.1~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。このようにして、抗原非特異的に活性化したTh1細胞とTc1細胞を誘導することができる。

次に、このようにして得られた非特異的な抗腫瘍活性をもつTh細胞あるいはTh1細胞およびTc1細胞に、腫瘍細胞に対する抗原特異性を付与する。Th細胞あるいはTh1細胞およびTc1細胞に抗原特異性を付与するための工程は、癌関連抗原を認識するTCRの遺伝子を導入して、TCRをそのTh細胞あるいはTh1細胞およびTc1細胞表面上で発現させることにより行う。TCRは、クラスI拘束性TCRであっても、クラスII拘束性TCRであってもよい。

- 10 TCR遺伝子は、腫瘍特異的なヒトCTLクローンから単離することができる。腫瘍特異的なCTLクローンは、ヒトから単離したT細胞を限界希釈することによりクローニングしてもよく、あるいはヒトから単離したCTLをインビトロで抗原の存在下で培養することにより誘導してもよい。TCR遺伝子は、TCR α 鎖遺伝子およびTCR β 鎖遺伝子に特異的な配列に対応するプライマーを用いて、
- 15 5' RACE法によりそれぞれ容易にクローニングすることができる。

- TCR遺伝子は、種々のウイルスベクターを用いてT細胞に導入することができる。このようなベクターとしては、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター、リポソーム等が挙げられる。ベクターは、T細胞中でTCR遺伝子が発現されるような様式で配列された、プロモーター領域、開始コドン、終止コドンおよびターミネーター領域等を含む。TCR遺伝子を組み込んだウイルスベクターは、適宜パッケージングプラスミド、ヘルパープラスミド等を利用して、上述の抗原非特異的に活性化したT細胞に導入することができる。このようにして、腫瘍細胞に対する特異性を付与されたTh細胞、Th1細胞およびTc
- 20 1細胞を得ることができる。

本発明の好ましい態様においては、抗原非特異的に活性化したT細胞として、MHCクラスII拘束性であるTh細胞を用い、これに腫瘍特異的CTLのTCR遺伝子を導入することにより、クラスI拘束性のTCRを発現して直接腫瘍細胞に結合しうるTh細胞を製造することができる。このようなTh細胞は、抗腫

瘍活性とヘルパー活性との両方を有するため、癌の治療において用いるのに非常に有用である。特に好ましくはT h細胞はT h 1細胞である。

さらに、上述のようにして得られた活性化T細胞の集団において、抗原特異性を付与されたT h細胞を精製してもよい。この工程は、CD 4抗体を結合した磁気ビーズを使用して抗原特異性を有するCD 4陽性細胞を単離することにより行うことができる。

また、上述のようにして得られた活性化T細胞の集団において、抗原特異性を付与されたT h 1細胞とT c 1細胞とを分離してもよい。この工程は、CD 4またはCD 8抗体を結合した磁気ビーズを使用して、抗原特異性を有するCD 4陽性細胞またはCD 8陽性細胞を単離することにより行うことができる。このようにして分離されたT h 1細胞とT c 1細胞とは、癌の治療において、最適な効果が得られるように任意の割合で混合することができる。

本発明の方法により得られた抗原特異性を付与されたT h細胞、T h 1細胞およびT c 1細胞の抗原特異性は、以下のようにして評価することができる。HLAがわかっているヒト末梢血単核球をEBウイルスによりトランスフォームしてリンフォブラスト細胞株（LCL）を得る。この培養液に、目的とする抗原の当該HLA拘束性ペプチドを添加することにより、ペプチドパルスを行う。この操作により細胞表面に当該HLA／抗原ペプチド複合体が発現したLCL細胞が得られる。次に、マイトマイシンC処理して不活性化したペプチドパルスLCL細胞、または対照としてペプチドパルスしていないLCL細胞と、本発明の方法により得られた抗原特異性を付与されたT h細胞、T h 1細胞またはT c 1細胞とを共培養する。培養上清中のIFN- γ またはIL-2の量を測定して比較することにより、抗原特異性を測定することができる。

また、本発明の方法により得られた抗原特異性を付与されたT h細胞、T h 1細胞またはT c 1細胞の抗腫瘍活性は、T細胞を ^{51}Cr 標識したペプチドパルスLCL細胞と一定時間接触させ、放出される ^{51}Cr の量を測定することにより評価することができる。

本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。また、本出願が有する優先権主張の基礎

となる出願である日本特許出願 2 0 0 3 - 4 2 5 0 0 9 号の明細書および図面に記載の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。

実施例

- 5 以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を制限するものではない。

実施例 1

- 10 H L A - A 2 4 陽性健常人由来の腫瘍抗原 W T 1 を有する腫瘍に特異的な C T L クローン T A K - 1 から、5' R A C E 法により T C R α 鎖遺伝子と T C R β 鎖遺伝子を単離し、配列を同定した。

H L A - A 2 4 陽性健常人 C T L 由来の W T 1 特異的な T C R α 鎖遺伝子と T C R β 鎖遺伝子をレンチウイルスベクター C S I I に組み込み大腸菌株 D H 1 0 B に導入後、増殖させたベクターを C a C l₂ 遠心法により精製した。

- 15 培養中の 2 9 3 T 細胞に H L A - A 2 4 陽性健常人 C T L 由来の W T 1 特異的な T C R α 鎖遺伝子、T C R β 鎖遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクター C S I I をパッケージングプラスミド p M D L g / p R R E、R e v 発現プラスミド p R V S - R e v、V S V - G プラスミド p M D . G と共に加えてさらに培養し、フォルスコリン処理後に該 T C R α 鎖遺伝子、T C R β 鎖遺伝子を組み込んだ
20 レンチウイルスベクターを多量に含む培養上清を回収した。

実施例 2

T細胞の非特異的活性化

- 25 あらかじめ、抗 C D 3 抗体を培養プレートに固相化させた抗 C D 3 抗体固相化プレートを準備しておき、末梢血から比重遠心法により回収した単核球を、1 0 0 I U / m l の I L - 2、5 0 I U / m l の I L - 1 2、1 0 n g / m l の I F N - γ 、2 μ g / m l の抗 I L - 4 抗体（タイプ 1 サイトカイン）を加えたタイプ 1 培養条件で培養した。

実施例 3

T C R 遺伝子を導入した T 細胞の調製

タイプ 1 培養条件で 2 日間培養した単核球に、実施例 1 で得られたレンチウイルスベクターを含む培養上清とタイプ 1 サイトカインとを加えて培養し、さらに
5 この 2 4 時間後にもレンチウイルスベクターを含む培養上清とタイプ 1 サイトカインを加えて培養することにより、非特異的に活性化した T 細胞に H L A - A 2 4 陽性健常人 C T L 由来の W T 1 特異的な T C R α 鎖遺伝子と T C R β 鎖遺伝子を導入した。

さらに 1 0 日間培養して、H L A - A 2 4 陽性健常人 C T L 由来の W T 1 特異
10 的な T C R α 鎖遺伝子と T C R β 鎖遺伝子を導入した活性化 T 細胞を増殖させた。

H L A - A 2 4 陽性健常人 C T L 由来の W T 1 特異的な T C R α 鎖遺伝子と T C R β 鎖遺伝子を導入し、タイプ 1 培養条件で非特異的に活性化した T 細胞を市販の M A C S マイクロビーズ C D 4 または M A C S マイクロビーズ C D 8 (ミル
15 テニー・バイオテック社) を用いて C D 4 陽性 T 細胞 (T h 1 細胞) または C D 8 陽性 T 細胞 (T c 1 細胞) をそれぞれ単離した。

実施例 4

T C R 遺伝子を導入した T 細胞の抗腫瘍活性の評価

ヒトの M H C クラス I 抗原の中で日本人に最も高い頻度で存在する H L A - A
20 2 4 陽性の健常人の末梢血単核球を E B ウイルスによりトランスフォームして得られた H L A - A 2 4 陽性リンフォブラスト細胞株 (L C L) を仮想腫瘍細胞とし、W T 1 タンパク質の H L A - A 2 4 拘束性ペプチドを $10 \mu \text{g} / \text{ml}$ の濃度で添加し 1 6 時間反応 (ペプチドをパルス) させた後、未反応のペプチドを洗浄した。この操作により細胞表面に H L A - A 2 4 / W T 1 ペプチド複合体が発現
25 した L C L 細胞が得られる。

実施例 3 で精製した T h 1 細胞 (W T 1 - A 2 4 T C R + T h 1 細胞) または T c 1 細胞 (W T 1 - A 2 4 T C R + T c 1 細胞) を、W T 1 ペプチドをパルスした L C L 細胞またはパルスしない L C L 細胞をマイトマイシン C 処理して不活性化したいずれかと 2 4 時間の共培養した後、培養上清中の I F N - γ と I L -

2の量を測定した。

その結果、WT1-A24TCR+Th1細胞とWT1-A24TCR+Tc1細胞のいずれにおいても、WT1ペプチドをパルスしたLCL細胞との共培養によりIFN- γ の産生が見られたが、ペプチドをパルスしないLCL細胞との共培養によつてはIFN- γ の産生は見られなかった（図1）。

また、IL-2の産生はWT1ペプチドをパルスしたLCL細胞と共培養した場合はWT1-A24TCR+Th1細胞では見られたものの、WT1-A24TCR+Tc1細胞ではTh1細胞と比べ低かった。ペプチドをパルスしないLCL細胞との共培養によつてはWT1-A24TCR+Th1細胞、WT1-A24TCR+Tc1細胞いずれにおいてもIL-2の産生は見られなかった（図2）。

なお、比較対照のWT1特異的TCR遺伝子を導入していないコントロールTh1細胞とコントロールTc1細胞では、WT1ペプチドをパルスLCL細胞との共培養によつてIFN- γ 、IL-2ともに産生は見られなかった（図1、2）。

⁵¹Cr標識したWT1ペプチドをパルスしたLCL細胞を標的細胞として、精製したWT1-A24TCR+Th1細胞またはWT1-A24TCR+Tc1細胞の細胞傷害活性を4時間の⁵¹Crリリースアッセイにて測定した。また比較対照としてのWT1特異的TCR遺伝子を導入していないコントロールTh1細胞とコントロールTc1細胞の細胞傷害活性の測定も行った。

その結果、WT1-A24TCR+Th1細胞では細胞傷害活性を示したが、コントロールTh1細胞では細胞傷害活性を示さなかった。また、WT1-A24TCR+Tc1細胞ではWT1-A24TCR+Th1細胞と比べて非常に強い細胞傷害活性を示したが、コントロールTc1細胞では細胞傷害活性を示さなかった。（図3）

以上の結果より、非特異的な抗腫瘍活性をもつTc1細胞に腫瘍特異的TCR遺伝子を導入することにより、腫瘍細胞を特異的に傷害しうる細胞に加工できることが示された。また、非特異的に活性化したMHCクラスII拘束性のTh1細胞に、MHCクラスI拘束性の抗原特異的CTLより得られたTCR遺伝子を

導入することにより、MHCクラスⅠ分子／抗原ペプチド複合体と反応できるヘルパー活性さらには抗腫瘍活性を有する細胞に加工できることが示された。

産業上の利用性

- 5 本発明の活性化T細胞医薬は、特異的に腫瘍細胞を傷害することができるため、癌の治療に有用である。

請求の範囲

1. 非特異的な抗腫瘍活性をもつT h細胞を誘導する工程と、そのT h細胞に抗原特異性を付与するための工程とを含むことを特徴とする、細胞治療用の細胞の製造方法。
- 5 2. T h細胞に抗原特異性を付与するための工程が、癌関連抗原を認識するT C Rの遺伝子を導入することにより行われる、請求項1記載の細胞治療用の細胞の製造方法。
3. T h細胞に抗原特異性を付与するための工程が、癌関連抗原を認識するク
- 10 ラスI拘束性T C Rの遺伝子を導入することにより行われる、請求項1記載の細胞治療用の細胞の製造方法。
4. T h細胞に抗原特異性を付与するための工程が、癌関連抗原を認識するク
- ラスII拘束性T C Rの遺伝子を導入することにより行われる、請求項1記載の細胞治療用の細胞の製造方法。
- 15 5. 癌関連抗原が、WT1、CEA、AFP、CA19-9、CA125、PSA、CA72-4、SCC、MK-1、MUC-1、p53、HER2、G250、gp-100、MAGE、BAGE、SART、MART、MYCN、BCR-ABL、TRP、LAGE、GAGEおよびNY-ESO1からなる群より選択される、請求項2-4のいずれかに記載の細胞治療用の細胞の製造方法。
- 20 6. 非特異的な抗腫瘍活性をもつT h細胞を誘導する工程が、T細胞を含む材料を、抗CD3抗体およびIL-2の存在下で培養することにより行われる、請求項1記載の細胞治療用の細胞の製造方法。
7. 抗原特異性を付与されたT h細胞を精製する工程をさらに含む、請求項1-6のいずれかに記載の細胞治療用の細胞の製造方法。
- 25 8. 抗原特異性を付与されたT h細胞を精製する工程が、抗体磁気ビーズを使用することにより行われる、請求項7記載の細胞治療用の細胞の製造方法。
9. 非特異的な抗腫瘍活性をもつT h1細胞とT c1細胞を誘導する工程と、そのT h1細胞とT c1細胞に抗原特異性を付与するための工程とを含むことを特徴とする、細胞治療用の細胞の製造方法。

10. Th1細胞とTc1細胞に抗原特異性を付与するための工程が、癌関連抗原を認識するTCRの遺伝子を導入することにより行われる、請求項9記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

5 11. Th1細胞とTc1細胞に抗原特異性を付与するための工程が、癌関連抗原を認識するクラスI拘束性TCRの遺伝子を導入することにより行われる、請求項9記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

12. Th1細胞とTc1細胞に抗原特異性を付与するための工程が、癌関連抗原を認識するクラスII拘束性TCRの遺伝子を導入することにより行われる、請求項9記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

10 13. 癌関連抗原が、WT1、CEA、AFP、CA19-9、CA125、PSA、CA72-4、SCC、MK-1、MUC-1、p53、HER2、G250、gp-100、MAGE、BAGE、SART、MART、MYCN、BCR-ABL、TRP、LAGE、GAGEおよびNY-ESO1からなる群より選択される、請求項9-12のいずれかに記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

14. 非特異的な抗腫瘍活性をもつTh1細胞とTc1細胞を誘導する工程が、T細胞を含む材料を、抗CD3抗体、IL-2、およびIL-12の存在下で培養することにより行われる、請求項9記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

15 15. 抗原特異性を付与されたTh1細胞とTc1細胞とを分離する工程をさらに含む、請求項9-14のいずれかに記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

16. 抗原特異性を付与されたTh1細胞とTc1細胞とを分離する工程が、抗体磁気ビーズを使用することにより行われる、請求項15記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

25 17. 分離されたTh1細胞とTc1細胞を任意の割合で混合する工程をさらに含む、請求項15または16に記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

18. 非特異的な抗腫瘍活性をもつTh細胞を誘導する工程と、そのTh細胞に抗原特異性を付与するための工程とを含む方法により製造される、細胞治療用の細胞。

19. 非特異的な抗腫瘍活性をもつTh1細胞とTc1細胞を誘導する工程と、

そのT h 1細胞とT c 1細胞に抗原特異性を付与するための工程とを含む方法により製造される、細胞治療用の細胞。

20. 患者から白血球細胞を取り出す工程と、前記白血球細胞から非特異的な抗腫瘍活性をもつT h細胞を誘導する工程と、そのT h細胞に抗原特異性を付与するための工程と、抗原特異性を付与されたT h細胞を前記患者に投与する工程とを含むことを特徴とする、腫瘍の予防または治療方法。

21. 患者から白血球細胞を取り出す工程と、前記白血球細胞から非特異的な抗腫瘍活性をもつT h 1細胞とT c 1細胞を誘導する工程と、そのT h 1細胞とT c 1細胞に抗原特異性を付与するための工程と、抗原特異性を付与されたT h 1細胞とT c 1細胞を前記患者に投与する工程とを含むことを特徴とする、腫瘍の予防または治療方法。

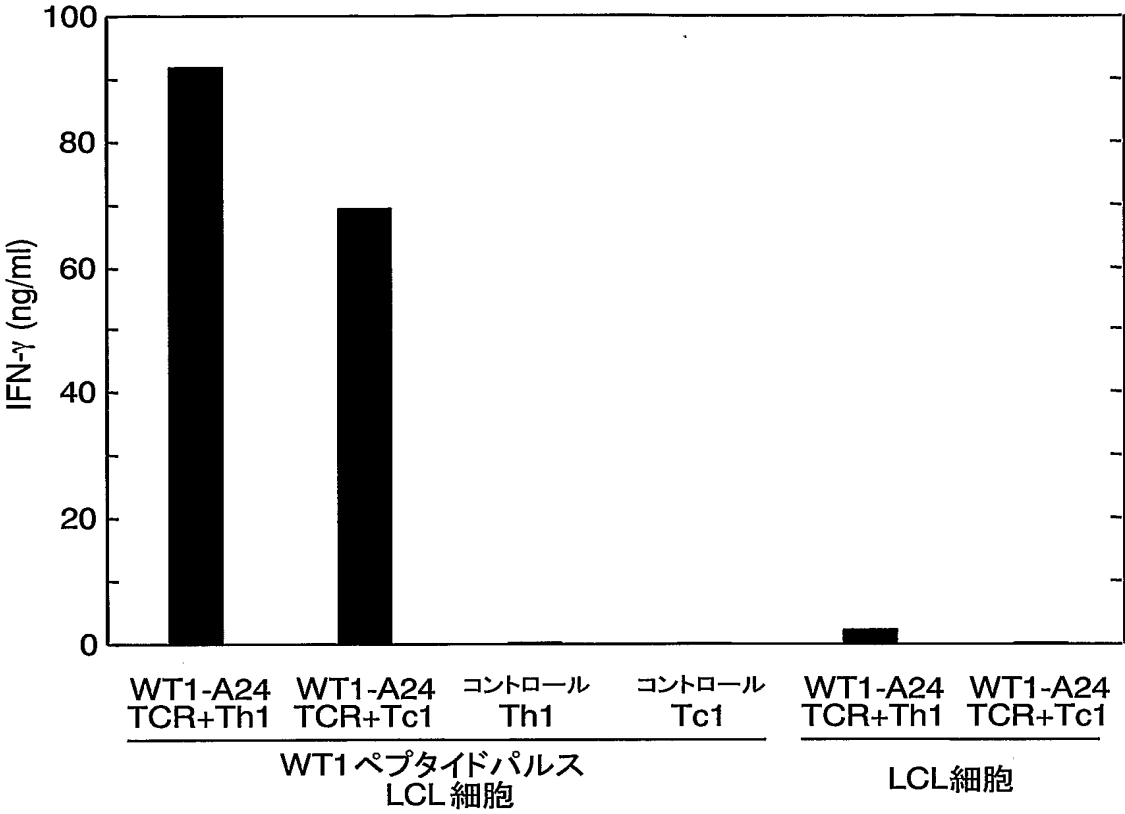


図1

2/3

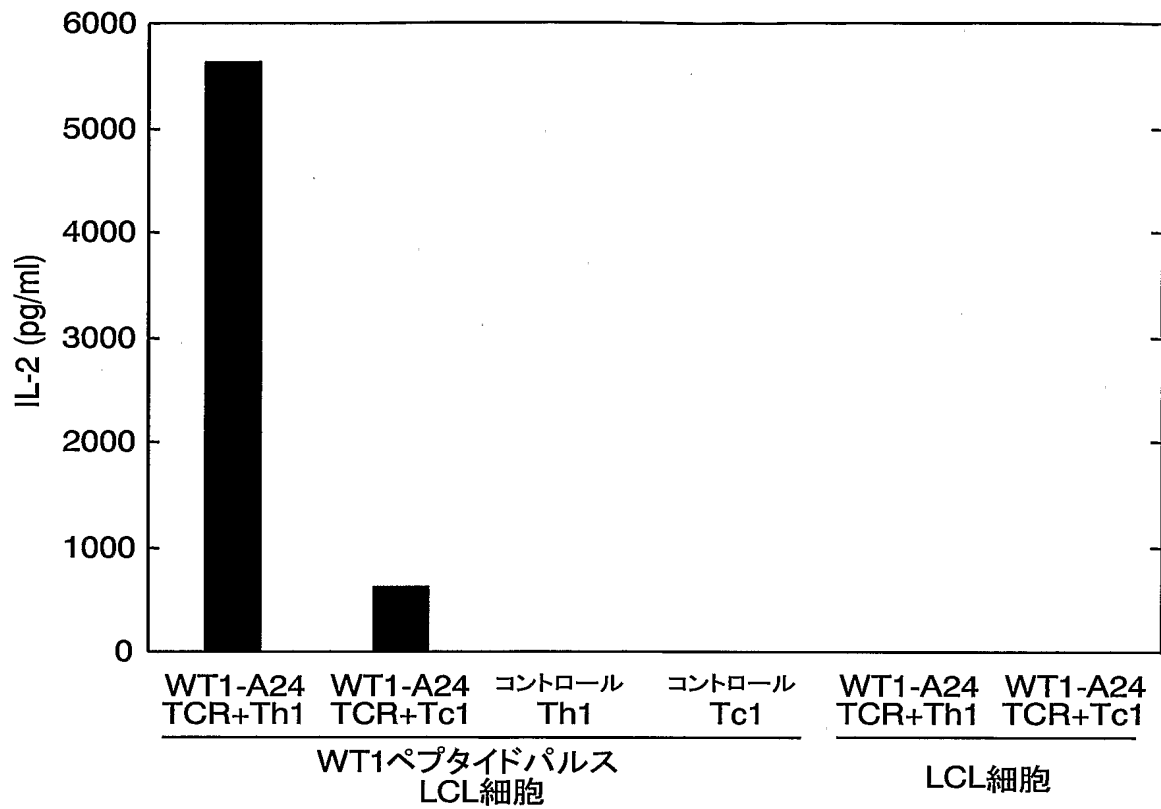


図2

3/3

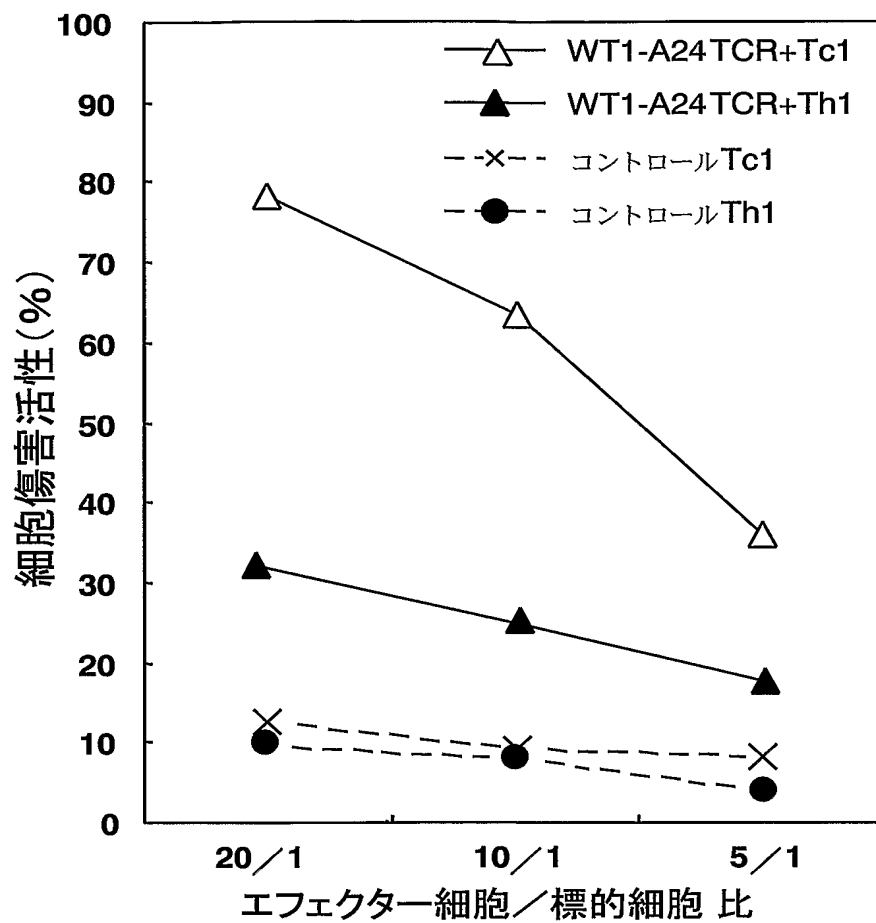


図3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019714

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N5/10, C12N15/12, A61K35/26, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N5/10, C12N15/12, A61K35/26, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), PUBMED

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Marimo SATO et al., "Jujo Saibo o Mochiita Saibo Men'eki Ryoho DC1/DC2 ni yoru Th1/Th2 Balance no Seigyo to Gan Chiryo eno Oyo", Igaku no Ayumi(2000), Vol.195, No.1, pages 3 to 8	1-19
Y	Koji NISHIMURA, "Gan Men'eki Ryoho ni okeru Th1/Th2 Saibo no Yakuwari Shorai no Chiryoho Hatten ni Mukatte", Cancer therapy & host (2000), Vol.12, No.4, pages 363 to 373	1-19
Y	Koji NISHIMURA, "Jujo Saibo Subset (DC1) to Th1 Saibo o Mochiita Atarashii Gan Waccine Saibo Chiryo", Clinical Immunology (2002), Vol.38, No.4, pages 363 to 369	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 March, 2005 (07.03.05)

Date of mailing of the international search report
22 March, 2005 (22.03.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019714

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Koji NISHIMURA, "Jujo Saibo Subset (DC1) to Th1 Saibo o Mochiita Atarashii Gan Vaccine Saibo Chiryo", Igaku no Ayumi (2002), Vol.200, No.6, pages 481 to 486	1-19
Y	Hirokichi KIKUCHI, "Gan Chiryo Hito Jika Gan Kyozeitsu no Men'ekigakuteki Bunshi Kiko", Monbusho Kagaku Kenkyuhi Hojokin ni yoru Gan Juten Kenkyu Hokokushu Roku, Heisei 8 Nendo Gan Kenkyu ni kakaru Juten Ryoiki Kenkyu (Gan Juten) (1997), pages 525 to 528	1-19
Y	Ko KINEBUCHI et al., "Gan Tokuiteki TCR o Mochiita Men'eki Idenshi Chiryo", Hematology & Oncology (1999), Vol.38, No.1, pages 22 to 29	1-19
Y	JEANNIN P. et al., IL-12 Synergizes with IL-2 and other stimuli in inducing IL-10 production by human T cells, J.Immunol.(1996), Vol.156, pages 3159 to 3165	6,14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019714

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 20-21
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions as set forth in claims 20 to 21 are relevant to diagnostic methods to be practiced on the human body or methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, (continued to extra sheet)
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019714

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N5/10, C12N15/12, A61K35/26, A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N5/10, C12N15/12, A61K35/26, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), PUBMED

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	佐藤まりも 他, 樹状細胞を用いた細胞免疫療法 DC1/DC2によるTh1/Th2バランスの制御と癌治療への応用, 医学のあゆみ(2000), Vol.195, No.1, p.3-8	1-19
Y	西村孝司, 癌免疫療法における Th1/Th2細胞の役割 将来の治療法発展に向かつて, 癌治療と宿主 (2000), Vol.12, No.4, p.363-373	1-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.03.2005

国際調査報告の発送日

22.3.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上 條 肇

4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	西村孝司, 樹状細胞サブセット(DC1)とTh1細胞を用いた新しい癌 ワクチン細胞治療, 臨床免疫(2002), Vol. 38, No. 4, p. 363-369	1 - 19
Y	西村孝司, 樹状細胞サブセット(DC1)とTh1細胞を用いた新しい癌 ワクチン細胞治療, 医学のあゆみ(2002), Vol. 200, No. 6, p. 481-486	1 - 19
Y	菊地浩吉, がん治療 ヒト自家癌拒絶の免疫学的分子機構, 文部省科学研究費補助金によるがん重点研究報告集録 平成8年度 がん研究に係る重点領域研究(がん重点)(1997), p. 525-528	1 - 19
Y	杵淵幸 他, 癌特異的TCRを用いた免疫遺伝子治療, 血液・腫瘍科(1999), Vol. 38, No. 1, p. 22-29	1 - 19
Y	JEANNIN P. et al., IL-12 synergizes with IL-2 and other stimuli in inducing IL-10 production by human T cells J. Immunol. (1996), Vol. 156, p. 3159-3165.	6, 14

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 20-21 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲20-21に係る発明は、人間の診断方法又は治療方法に該当するから、特許協力条約第17条(2)(a)(i)及び特許協力条約に基づく規則39.1(iv)の規定によりこの国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。